Lane Medical Library

STANFORD UNIVERSITY
JUL
25
1939
LIBRARY

Aus der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Veterinärklinik
der Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Küst
und dem Parasitologischen Laboratorium, I. G. Werk Frankfurt/Höchst
Leiter: Dr. habil. O. Wagner

Der mikroskopische Nachweis der Rinder-Genital-Trichomonaden (Trichomonas genitalis bovis) unter Berücksichtigung der gebräuchlichsten Färbemethoden

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der veterinärmedizinischen Fakultät
der Hessischen Ludwigs-Universität
zu Gießen

vorgelegt von
Heinrich Maaßen
Tierarzt aus Altona

Gießen 1938

Brühlsche Universitätsdruckerei, Gießen

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Gießen
Referenten: Professor Dr. Küst
Professor Dr. Beller

Meinen lieben Eltern!

Inhaltsverzeichnis.

I. Einleitung 3
II. Schrifttum 4
III. Eigene Untersuchungen 13
1. Nativpräparat 13
2. Kontrastfärbungen 15
3. Vitalfärbungen 17
4. Dauerpräparate 20
a) ohne vorherige Fixation 20
b) mit vorheriger Fixation 24
c) Budapester Methode modifiziert nach Hees 29
IV. Untersuchung mit trichomonadenverdächtigem Material 36
V. Schlußbetrachtung 37
VI. Autorenverzeichnis 40

I. Einleitung.

Für den Nachweis der Trichomonaden diente bisher ausschließlich das Nativpräparat, das sich bis jetzt auch als das leistungsfähigste Erkenntnismittel erwiesen hat. In sehr vielen Fällen von Endometritis catarrhalis und E. catarrhalis et purulenta, wo der klinische Befund eindeutig für eine Trichomonadeninfektion spricht, ist es schwierig, im Nativpräparat die Protozoen nachzuweisen. Manchmal werden Gebilde gefunden, die nicht einwandfrei als Trichomonaden bestimmt werden können. Auch im Pyometrainhalt finden sich nicht selten Formen, die nicht sicher als Trichomonaden zu erkennen sind. Ich bekam die Aufgabe, verschiedene Färbemethoden daraufhin zu untersuchen, inwieweit sie für die bessere Erkennung und Darstellung der Rindergeschlechtstrichomonaden verwertbar sind.

II. Schrifttum.

Im Jahre 1836 fand Donné (6) in Paris bei mikroskopischen Untersuchungen bei Frauen und Mädchen öfters Scheidenparasiten, welche später von Doflein (5), Bensen (3), v. Prowazek (20), Neumann und Mayer (15) näher beschrieben sind. Sie gaben an, daß dieser Parasit, Trichomonas vaginalis, bald birnenförmige, bald ovale oder kugelige Gestalt annimmt und schnelle Bewegungen mit Geißeln ausführt. Der Erreger besitzt vier Kopfgeißeln und eine undulierende Membran, die nicht in eine Endgeißel ausläuft.

Rodenwaldt (22), Westphal (29) u. a. beschreiben diese Flagellatenart ausführlich. Die Trichomonaden gehören der Flagellatenordnung der Polymastigina an. Sie sind mit 3—5 Geißeln, die dem Basalkorn entspringen, ausgestattet. Der Zellkern ist durch den Rhizoplasten mit dem Basalkorn verbunden. Außerdem entspringt dem Basalkorn der Achsenstab, der als mehr oder weniger dicker Stab durch das Protoplasma läuft und gewissermaßen als Skelettstütze dient. Zur Fortbewegung dient außer den Geißeln die undulierende Membran. Sie besteht aus der Rippe, Basalfibrille, die der Membran nach Dobell (zit. n. Rodenwaldt) als „chromatische Basis" dient, dem Randfaden, der, außen der Membran anliegend, nach dem Hinter-

ende hinzieht und am Ende der Membran als Endgeißel freiwerden kann oder im Protoplasma dicht unter der äußeren Hülle endigt. Um die Form bei der Bewegung zu erhalten, wird der Protoplasmaleib von einem Periplast umgeben, der bei den einzelnen Arten verschieden stark entwickelt ist.

Im Jahre 1900 fand Mazzanti (13) im Scheiden- und Gebärmuttersekret bei einem notgeschlachteten Jungrind und zwei weiteren Kühen, welche dauernd unfruchtbar waren, Infusorien von länglicher, ovaler, spindelförmiger, rundlicher Gestalt und außerordentlich lebhafter Beweglichkeit. Er nannte diese Flagellaten „Trichomonas utero vaginalis".

Drescher und Hopfengärtner (7) wiesen die Trichomonaden auf folgende Art und Weise nach. Sie setzten dem Frischpräparat Karrageendekokt hinzu, wodurch die Bewegung der Trichomonaden gehemmt wurde. Um weiter die ungefärbten Trichomonaden von dem Untergrunde zu unterscheiden, setzten sie einige Tropfen einer 2prozentigen Eosinlösung zu. Wenn sie bewegliche Trichomonaden nicht sahen, wurde bei Vergrößerung 1:400 auf birnförmige bis kugelförmige Gebilde mit starkem Lichthof und homogenem Aussehen geachtet. Bei ihrer Färbemethode verwandten sie Osmiumsäure, die mit einer Öse Material verrieben wurde. Das lufttrockene Präparat wurde eine Minute in Fuchsinlösung gebracht. Hiermit wurden brauchbare Präparate erzielt.

Sziklai (26) verwandte zur besseren Sichtbarmachung der Trichomonaden im Nativpräparat bei Vitalfärbung die Ehrlichsche Neutralrotfärbung.

Glage (10) gibt in seinem Lehrbuche an, daß durch Zusetzung von 2prozentiger Eosinlösung die ungefärbten Trichomonaden sich von dem Untergrunde besser abheben, und die abgestorbenen Trichomonaden sich mitfärben.

Hegner und Becker (12) benutzten für die Diagnose Eosin- oder Neutralrotlösung 1:10000, wenn die Lebensfähigkeit der Zysten zu bestimmen war. Tote Zysten färbten sich, lebendige nicht.

Westphal (29) wandte die Donaldsonfärbung an, die aus einer schwachen, mit Eosin kombinierten Jodfärbung besteht und keine Herstellung von Dauerpräparaten gestattet. Sie ergibt eine zarte Zeichnung der Geißeln und der Oberfläche und vermittelt, da die Farblösung ohne weitere Vorbehandlung des Objektes dem frischen Präparat hinzugesetzt wird, einen plastischen Eindruck der äußeren morphologischen Verhältnisse.

Matsudo und Kazuhiko (14) machten Versuche mit 148 verschiedenen Farbstoffen für die Vitalfärbung der Trichomonaden. Es

zeigte sich, daß nur etwa 20 meist basische Farbstoffe sich zur Vitalfärbung eigneten, unter ihnen Methylenblau, Methylviolett, Nilblau, Smaragdgrün und Vesuvin. Saure Farbstoffe eigneten sich nicht. Bei der Färbung traten zuerst Farbkörnchen im Frontteile des Parasiten auf, später eine leichte diffuse Färbung des Zytoplasmas. Die Bewegung des Parasiten wurde dabei etwas langsamer und hörte schließlich auf.

Oehler (18) machte die Vitalfärbung mit der Riegelschen Chloroform-Azurlösung. Er verstrich einen Tropfen dieser Lösung auf dem Deckgläschen und ließ es verdunsten. Dann wurde das so gefärbte Deckgläschen auf die zu untersuchende Masse gelegt und unter dem Mikroskop untersucht. Sich bewegende Amöben zeigten aufgenommene Bakterien und die aus ihnen zusammengeschmolzenen Körner in den Vakuolen. Trichomonas wies große, rote, schollige Einschlüsse auf.

Streit (24) schreibt, daß von den bisher bekannten Methoden des Nachweises der Trichomonaden des Menschen das Nativpräparat am leistungsfähigsten ist. Gefärbtes Trockenpräparat und Vitalfärbung sind zu unzuverlässig. Das Dunkelfeld ist überflüssig und die Kultur als diagnostisches Hilfsmittel zu umständlich. Das Nativpräparat erlaubt, ohne Mühe bewegliche Trichomonaden zu erkennen, versagt aber nicht selten, wenn es nur unbewegliche Formen enthält. Durch Lebendfixierung mit 1prozentiger Milchsäure und Färbung mit 1prozentiger Malachitgrün- oder Methylenblaulösung können auch unbewegliche Dauerformen sicher erkannt werden. Nicht färbbare Trichomonaden sind nicht als Dauerformen, sondern als abgestorbene Trichomonaden anzusehen.

Pfenninger (19) beschrieb die mit Giemsalösung und Methylenblau gefärbten Trichomonaden genauer. Er sah sie als spindelförmige, länglich ovale Gebilde mit drei kopfständigen, einer endständigen Geißel und einer undulierenden Membran.

Schmid und Kamniker (23) färbten die Präparate nach Gram und konnten Zystenformen feststellen. Diese Formen wurden von beiden Autoren für die Dauerform gehalten.

Daust (4) stellte fest, daß zur färberischen Darstellung Karbolfuchsin, ferner Safranin und die Giemsalösung sich am besten eigneten. Mit Karbolfuchsin ließen sich sehr gut die Geißeln, Membran, der Basalkörper und der Kern färben.

Riedmüller (21) stieß bei näherer Untersuchung bei der färberischen Darstellung auf Schwierigkeiten. Die gefärbten Trichomonaden ließen sich kaum von Leukozyten und Epithelien unterscheiden. Am besten gelang ihm die Färbung der Protozoen nach der Giemsa-Romanowsky-Methode.

Glage (10) führt mehrere Methoden zur Färbung der Protozoen an. Eine einfache Färbemethode ist die nach Romanowsky. Das dünne, lufttrockene Präparat wird in Methylalkohol gehärtet und dann 10—15 Minuten mit einer verdünnten Giemsalösung (1 Tropfen Giemsalösung auf etwa 1 ccm Wasser) gefärbt.

Bei der Methode nach May-Grünwald werden die Präparate getrocknet und etwa 5 Minuten lang in May-Grünwaldlösung gefärbt.

Bei der Heidenhainschen (zit. n. Glage) Hämotoxylinfärbung werden die Präparate lange in Eisenalaun differenziert und dann nach Mallory gefärbt ($^1/_{10}$prozentige Säurefuchsin, dann 1prozentige Phosphormolybdänsäure, endlich ein Gemenge von gleichen Teilen 0,5prozentigem Anilinblau + 2% Orange G + 2% Oxalsäure), und nachher wird die Löfflersche Geißelbeize (3—4 Stunden) angewandt und nachfolgend mit Anilinfuchsin gefärbt. Ferner gibt der Verfasser noch die Schnellfärbemethoden nach Giemsa, Shmamine und Manceaux an.

Nöller (16) wendet folgende Methode zur Herstellung von feuchtfixierten Dauerpräparaten an: Das Deckglas wird mit Material bestrichen und mit der Schicht nach unten in die Fixierungsflüssigkeit gelegt, so daß das Deckglas oben auf der Flüssigkeit schwimmt. Dadurch tritt eine Gerinnung der Eiweißbestandteile ein. Wenn man Darminhalt oder Material mit wenig gerinnungsfähigen Eiweißsubstanzen ausstreichen will, so wird es mit gleicher Menge inaktivierten Serums oder mit Hühnereiweiß vermischt und ausgestrichen. Unter den Fixierungsflüssigkeiten führt der Autor folgende an: Sublimatlösungen, Pikrinsäuregemische, Formalin und Platinchloridessigsäure. Die gebräuchlichsten sind die Sublimatlösungen entweder als konzentrierte Lösung (100,0 Aqua dest., 7,0 Sublimat und 1,0 Kochsalz) oder als Schaudinnscher Sublimatalkohol. Auch wird zur Fixierung wässerige konzentrierte Sublimatlösung mit 0,5—5prozentigem Eisessigzusatz benutzt. Die Präparate werden heiß 2—10 Minuten oder kalt 15—60 Minuten fixiert. Anschließend werden sie 20—60 Minuten in Lugolscher Lösung gejodet und dann 10 Minuten lang in $^1/_2$—1prozentiger Natriumthiosulfatlösung entjodet. Daraufhin werden die Präparate in Wasser gespült und in verdünnter Giemsalösung gefärbt. Um eine gute Differenzierung der gefärbten Protozoen zu erzielen, wendet der Verfasser verschiedene Azeton-Xylolgemische an. Die Stufen sind: I. Azeton. II. 4 Teile Azeton und 1 Teil Xylol. III. 1 Teil Azeton und 1 Teil Xylol. IV. 1 Teil Azeton und 4 Teile Xylol. V. Xylol. Dieses Verfahren wird speziell für Methylenblau- und Giemsafärbung angewandt. Das Aufwärtsführen in den Azeton-Xylolgemischen übernimmt bei der Methylenblaufärbung noch die

Aufgabe der Differenzierung, da Azeton die überschüssige Färbung auszieht, ohne die Chromatinfärbung bei der Giemsafärbung zu vernichten.

Westphal (29) wendet für die Herstellung von Dauerpräparaten die Feuchtfixierung mit Osmiumdämpfen an. Die Herstellung der Präparate erfolgt durch Ausstreichen eines Kultur- oder Sekrettropfens, der vorher kurz durch Osmiumsäuredämpfe fixiert ist, dann schnelles Trocknen und Härten in Methylalkohol und anschließendes Färben in verdünnter Giemsalösung. Gildemeister (9) beschreibt die Methode der Osmiumsäurefixierung folgendermaßen: Die sehr dünnen Ausstrichpräparate (je nach Konsistenz des Materials mit Serum verdünnt) werden noch feucht mit Osmiumsäuredämpfen 1—2 Minuten fixiert. Darauf werden die lufttrockenen Präparate in Methylalkohol 10 Minuten lang nachfixiert und dann anschließend ohne vorherige Abspülung 30 Minuten lang in Giemsalösung (2 Tropfen auf 1 ccm Aqua dest.) gefärbt. Die Färbung muß hierbei unter dem Mikroskop nachkontrolliert werden. Je nach Dicke des Materials muß von Fall zu Fall kürzer oder länger gefärbt werden. Hierauf werden die Präparate kurz abgespült und getrocknet.

Diese Methode wurde im Parasitologischen Laboratorium der I. G. Farbenindustrie, Werk Höchst, von Dr. O. Wagner (28) ausprobiert. Sie eignet sich besonders gut, um das Studium der feineren Struktur der Protozoen zu ermöglichen. Um eine sehr gute Fixierung und einen möglichst sparsamen Verbrauch der teuren Osmiumsäure zu erzielen, hat Dr. Wagner ein besonders konstruiertes Fixierungsgefäß herstellen lassen. Das Gefäß stellt ein 10 cm langes und 2,8 bis 3 cm weites Glasrohr dar. An dem einen Ende befindet sich eine Glaskugel von 3 cm Durchmesser, die durch eine enge Öffnung mit dem Glasrohr verbunden ist. In diese Glaskugel wird Glaswolle mit 3—5 ccm Osmiumsäure hineingebracht. Das andere Ende des Glasrohres ist offen und wird mit einem Korken verschlossen.

Galli-Valerio (8) fixiert die noch feuchten Präparate in 4prozentigem Formalin und färbt sie 24 Stunden lang in einer stark verdünnten Giemsalösung.

Schilling (zit. n. Nöller (16)) hat die Giemsafärbung modifiziert. Er setzt die Lösung folgendermaßen zusammen:

Methylenblau	2,0
Borax	5,0
Wasser	100,0

Sie liefert auch dort gute Ergebnisse, wo kein einwandfreies destilliertes Wasser zu haben ist. Auch in den Tropen und sogar bei Ver-

wendung von abgekochtem Brunnenwasser hat sich die Modifikation bewährt.

Bélar (1) erwähnt eine Reihe von Farbstoffen, mit denen die Protozoen gefärbt werden. Außer den sauren Farbstoffen wie Hämatoxylin, Hämalalaun, Eisentrioxyhämatëin, Eisenbrasilin führt der Autor eine Reihe von basischen Anilinfarbstoffen an. Die hauptsächlichsten sind Safranin, verbunden mit anderen Farbstoffen. So hat Flemming (zit. n. d. Autor) eine Dreifachfärbung mit Safranin, Gentianoviolett und Orange G ausgearbeitet. Die Ehrlich-Biondi-Heidenhainsche Methode besteht aus Methylgrün, Fuchsin und Orange G. R. Krause (zit. n. d. Autor) arbeitet mit Methylgrün, Säurefuchsin und Orange G (Triazidfärbung), die sich für Blutaufstriche eignet. Der Autor empfiehlt mit Romeis (zit. n. d. Autor) für Chromatinfärbung in erster Linie Anthrazenblau, Gallozyanin und Naphthopurpurin.

Uhlenhuth und Kraus (27) führen mehrere Karminfärbungen an: Alaunkarmin n. Grenacher (zit. n. d. Verf.) und Karmalaun n. Mayer (zit. n. d. Verf.). Bei beiden Arten färben sich die Kerne violett, das Protoplasma bleibt ungefärbt. Mit Boraxkarmin n. Grenacher (zit. n. d. Verf.) färbt sich der Kern rot, wobei die Struktur meist sehr gut zu erkennen ist. Pikrokarmin färbt den Kern rot und das Protoplasma gelb. Indigokarmin besitzt keine weitere Bedeutung, da es diffus färbt.

Nöller (16) erwähnt noch die Safranin-Lichtgrünfärbung n. Jollas (zit. n. d. Verf.). Sie gibt schöne Kernteilungsbilder und unterscheidet bei den Kernteilungsfiguren das rote bis rotviolette Chromatin scharf von dem grünen bis blaugrünen Protoplasma. Diese Färbung gelingt nur einwandfrei bei den mit Osmiumsäuregemischen fixierten Präparaten.

Nöller (17) bedeckt die für die Giemsamethode üblich fixierten Präparate mit inaktiviertem Pferdeserum, welches auf dem Präparat antrocknen soll. Die Färbung vollzieht sich dann durch die Serumschicht hindurch und ergibt eine sehr schöne Differenzierung der Flagellaten.

Hees (11) verreibt das Material mit einer Pufferlösung (500,0 Aqua dest., 0,75 Natriumphosphat, 0,245 Kaliumphosphat, 0,004 Kaliumchlorid) und läßt es schnell trocknen. Anschließend werden die Präparate in Methylalkohol gehärtet und in verdünnter Giemsalösung gefärbt.

Szendi (25) gelang es, mittels eines Färbeverfahrens den Nachweis des Trichomonas vaginalis wesentlich zu erleichtern und somit die Diagnose zu fördern.

III. Eigene Untersuchungen.

Als Untersuchungsmaterial diente mir der Inhalt des Mast- und Blinddarmes der Katze, wo Trichomonaden (Trichomonas felis) sehr oft in Reinkultur leben. Außerdem machte ich Versuche mit Rindertrichomonaden in Kultur in Pyometraeiter und im Vaginalsekret, um Vergleiche über die Brauchbarkeit der einzelnen Färbemethoden anstellen zu können.

Nach der Untersuchung im Nativpräparat prüfte ich die Kontrastfärbungen und einige Arten der Vitalfärbungen, um festzustellen, ob sich die Methoden für die Diagnose besser eignen als das Nativpräparat und vor allen Dingen, ob sie sich in der Praxis anwenden lassen.

Bei der Herstellung der Dauerpräparate benutzte ich nur die einfachen Fixationsmethoden, da die schwierigeren im Gebrauch meistens sehr teuer sind, sehr viel Zeit beanspruchen und für die Praxis nicht verwertbar sind.

1. Das Nativpräparat.

Verschiedene Forscher, die sich mit der Frage der Trichomoniasis beschäftigen, beschreiben die Trichomonaden im Nativpräparat eingehend. Mazzanti (13), Drescher und Hopfengärtner (7) u. a. sehen sie als längliche, ovale Gebilde, die sich sehr lebhaft hin- und herbewegen. Sie besitzen an ihrem Kopfende drei Geißeln, mit denen sie ruderartige Bewegungen ausführen. Ebenso bewegt sich die undulierende Membran lebhaft hin und her.

Im Nativpräparat konnte ich die Trichomonaden (Trichomonas genitalis bovis) als sich lebhaft bewegende Gebilde sofort von den Leukozyten unterscheiden. Je nach Beschaffenheit des Materials nahmen sie schmale, ovale oder kreisrunde Gestalt an. Im Protoplasma befanden sich mehr oder weniger große Vakuolen, die bei genügender Abblendung besser zum Vorschein kamen. Die Geißeln und die undulierende Membran waren sehr gut bei genügender Abblendung zu erkennen. Allerdings lagen die Trichomonaden in sehr zähem Schleim vielfach still. Nur an ihrer beweglichen Membran konnten sie bei stärkerer Vergrößerung sicher erkannt werden. Auch änderten sie rasch hintereinander ihre Gestalt. Öfters konnte ich beobachten, daß rundlich zusammengezogene Trichomonaden nach Abwerfen der Geißeln amöboide Bewegungen ausführten.

Im Nativpräparat ließen sich auch abgestorbene Trichomonaden finden. Allerdings gelang es mir nur, sie als solche festzustellen, wenn

die ovale Form noch erhalten war, und diese Form im Material nicht vereinzelt vorkam. Von den Leukozyten ließen sich die abgestorbenen Trichomonaden nur durch die schmalere Form unterscheiden. Wenn ich dieses Material nach mehrtägigem Stehenlassen erneut untersuchte, fanden sich zerfetzte Formen, die ich aber nicht mit Sicherheit als Trichomonaden deuten konnte, da die Ähnlichkeit mit den zerfallenen Leukozyten zu groß war.

Bei Untersuchung im Dunkelfelde traten die Vakuolen im Protoplasma etwas deutlicher hervor. Der Zellkern konnte als ein schattenhaftes Gebilde vom Protoplasma unterschieden werden. Vor allen Dingen hoben sich die Geißeln, die undulierende Membran und der Endfaden leuchtend vom dunklen Untergrunde ab. In manchen Fällen erschien der Periplast sehr deutlich. Abgestorbene Trichomonaden, auch wenn die Form noch erhalten war, konnten im Hellfelde wesentlich besser erkannt werden.

So weist das Dunkelfeld gegenüber dem Hellfelde für die Praxis keine wesentlichen Vorteile auf. Die Trichomonaden können im Hellfelde ebenso gut erkannt werden wie im Dunkelfelde. Außerdem ist es in der Praxis schwierig, mit der Dunkelfeldmethode zu arbeiten, da eine sehr starke Vergrößerung gebraucht wird, und es meistens auch an einer genügend starken Lichtquelle fehlt. Für morphologische Untersuchungen leistet das Dunkelfeld vorzügliche Dienste.

2. Kontrastfärbungen.

Um die Trichomonaden besser vom Untergrunde unterscheiden zu können, setzten verschiedene Forscher dem Material Farbstoffe hinzu. Da sich die Trichomonaden nicht mitfärbten, hoben sie sich als helle, stark lichtbrechende Gebilde vom gefärbten Untergrunde ab. Drescher und Hopfengärtner (7) benutzten 2prozentige Eosinlösung. Sziklai (26) setzte dem Material Ehrlichsche Neutralrotlösung zu. Hegner und Becker (12) arbeiteten ebenfalls mit der Neutralrotlösung 1:10000 und mit Eosin. Bender und Hettche (2) benutzten Brillantkresylblau. Streit (24) gebraucht für die Vitalfärbung 1prozentige Methylenblau- oder Malchitgrünlösung.

Ich habe dem Material verschiedene Farbstoffe hinzugesetzt. Verwandt wurden in verschiedenen Konzentrationen Eosin, Neutralrot, Brillantkresylblau, Orange G, Malachitgrün und Methylenblau. Hierbei ist es nach meinen Untersuchungen nicht so sehr von Bedeutung, welche Farblösung gebraucht wird, sondern es ist darauf zu achten, daß die Lösungen nicht allzu kräftig färben. Weiterhin ist es wichtig, daß die Schicht auf dem Objektträger nicht zu dick aufgetragen

wird, sonst erscheinen fast alle Trichomonaden infolge der darüberliegenden gefärbten Schicht mitgefärbt.

Vielfach setzte ich dem Material 1prozentige Eosinlösung hinzu, weil hiermit die besten Ergebnisse erzielt wurden, und diese Lösung jederzeit zur Verfügung steht, und verrieb beides miteinander, damit sich die Zellelemente innig mit dem Farbstoffe mischten. 2prozentige Eosinlösung benutzte ich nicht, da sie nach meinen Untersuchungen zu stark färbte. Die Trichomonaden hoben sich sehr deutlich vom gefärbten Untergrunde ab. Außer den sich bewegenden Trichomonaden entdeckte ich kreisrunde oder ovale ungefärbte Zellelemente, bei denen nicht zu unterscheiden war, ob sie unbewegliche Trichomonaden oder ungefärbte Leukozyten darstellten.

Wie schon erwähnt, erscheinen im dickaufgetragenen Präparat die Trichomonaden stets mitgefärbt. Dies ist besonders der Fall, wenn zähes, schleimiges Material untersucht werden soll. In solchen Fällen muß zuerst der Schleim mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden, und dann kann der dünnflüssigere Schleim mit Eosinlösung verrieben werden.

Mit den Kontrastfärbungen können abgestorbene Trichomonaden nicht nachgewiesen werden, da sie sich mitfärben. Zuerst färbt sich das Protoplasma und zuletzt der Kern (Glage [10]).

3. Vitalfärbungen.

Aus einer großen Anzahl von Vitalfärbemethoden habe ich zwei nachgeprüft, die mehr der Diagnostik als der Forschung dienen.

A. Vitalfärbung mit dem Riegelschen Chloroform-Azur (Oehler [18]).

Manson Lösung (Methylenblau medicinale Höchst 2,0 + Borax 5,0 + Wasser 100,0) wird mit Chloroform etwa zu gleichen Teilen ausgeschüttelt. Die dunkelblaurote Chloroform-Azurlösung wird vom überstehenden Wassermethylenblau durch Abhebern und Filtrieren getrennt. Ein Tropfen dieser Chloroform-Azurlösung wird auf dem Deckglas zum Verdunsten gebracht und verstrichen. Ein kleiner Tropfen Untersuchungsmasse kommt auf den Objektträger. Das Deckglas mit der Farbschicht wird aufgelegt und angedrückt. Bewegte Amöben zeigen aufgenommene Bakterien und die aus ihnen zusammengeschmolzenen Körner in den Vakuolen. Trichomonas zeigt große, rote, schollige Einschlüsse.

Es handelt sich hierbei um die bekannte „Vitalfärbung mit Methylenblau". Nur kommt sie mit der Chloroform-Azurfarbe besonders gut und ausgiebig zustande.

Statt der Azurlösung wandte ich die Methylenblaulösung mit Chloroform an. Die Trichomonaden konnte ich sehr deutlich von den Leukozyten unterscheiden, da der Leukozytenkern sich intensiv blau färbte, und das Protoplasma ungefärbt blieb. Auch unbewegliche oder schwach bewegliche Trichomonaden konnten sehr gut an ihren hellblau gefärbten Einschlüssen erkannt werden. Der Zellkern färbte sich öfters ganz schwach mit.

B. Vitalfärbung nach Streit (24):

In ein niedriges Reagenzgläschen, das ½—¾ ccm physiologische Kochsalzlösung enthält, werden mehrere Archsche Sekretlöffelchen voll Scheideninhalt gebracht, so daß eine stark trübe Aufschwemmung entsteht, zu der ¾—1 ccm 1prozentige Milchsäurelösung und 2 Tropfen 1prozentige wässerige Malachitgrünlösung gegeben werden. Nach ½—1minütigem Durchschütteln wird das Röhrchen über der Flamme etwas erwärmt. Mit einer Pipette wird 1 Tropfen auf einen Objektträger gebracht, und dieses mit einem Deckglas bedeckte Präparat mit starkem Trockensystem untersucht. Die in jedem Falle unbeweglichen, runden oder ovalen Trichomonaden färben sich hell- bis dunkelgrün und sehen infolge der Vakuolen ganz grobkörnig aus. Durch ihre Größe unterscheiden sie sich wesentlich von den Leukozyten. Die Kerne sind dunkelgrün und, obschon undeutlich vom Plasma abgegrenzt, meist gut kenntlich, gewöhnlich klein und kompakt, seltener auch fast bläschenförmig (ähnlich Epithelzellkernen) oder polymorph. Die Lymphozyten und Leukozyten sind gewöhnlich deutlich kleiner mit stark grün gefärbten Kernen und farblosem Protoplasma oder höchstens viel feinkörniger als die Vakuolen der Trichomonaden. Die Epithelzellen weisen einen gut gefärbten, bläschenförmigen Kern und ein schwach gefärbtes Protoplasma auf. Bei Verwendung von 1prozentigem Methylenblau, das eine geringere Färbekraft als Malachitgrün hat, muß nahe bis zum Siedepunkt erwärmt werden, während das Erhitzen der Malachitgrünaufschwemmung nur mäßig stark erfolgen darf, da sich sonst auch das Plasma der Leukozyten und der Epithelien zu intensiv färben kann. Ist die Färbung im ganzen zu schwach, oder werden trichomonasverdächtige, schwach gefärbte oder überhaupt keine gefärbten Zellen gefunden, so kann die Färbung durch nochmaliges, längeres Erwärmen verstärkt werden. Das gleiche wird auch durch Zusatz von 1—2 Tropfen $^1/_{10}$ n Natronlauge erreicht. Sehr schöne, kontrastreiche Bilder werden durch einstündiges Einwirken der Milchsäure und des Methylenblaus ohne Erwärmen erzielt. Doch kommt diese Modifikation aus praktischen Gründen kaum in Frage. Das Scheidensekret kann statt in Kochsalzlösung auch direkt in ½

bis ¾ ccm 1prozentige Milchsäurelösung gebracht werden. Die weitere Verarbeitung (Färben und Erwärmen) muß innerhalb der nächsten 15 Minuten erfolgen. Für die Praxis bewährt sich die Methode in folgender Ausführung am besten: Abnehmen in physiologischer Kochsalziösung. Zuerst Untersuchung im Nativpräparat, was innerhalb der nächsten 6—8 Stunden geschehen muß. Sind keine beweglichen Trichomonaden vorhanden, so wird die Milchsäure-Malachitgrünfärbung vorgenommen, die auch noch 24 Stunden nach der Entnahme des Scheideninhaltes ausgeführt werden kann.

Mit dieser Methode versuchte ich, Trichomonaden in Kultur und in Pyometraeiter nachzuweisen. Es gelang mir nicht, durch Unterschiede in Größe, Vakuolisierung und verschiedene Färbbarkeit der Kerne die Trichomonaden von den Leukozyten zu unterscheiden. Wohl fand ich Formen, deren Kerne dunkler gefärbt waren. Aber auf Grund dieses einzigen Merkmals konnte ich sie nicht mit Sicherheit als Trichomonaden erkennen. Da Trichomonas genitalis bovis ungefähr dieselbe Größe besitzt wie die Leukozyten und feiner vakuolisiert ist als Trichomonas vaginalis hominis, ist es sehr schwer, sie von den Leukozyten zu differenzieren.

4. Dauerpräparate.

Da auf dem Wege der Kontrast- und Vitalfärbungen keine einwandfreien und befriedigenden Diagnosen gestellt werden können, sind die verschiedenen Arten in der Herstellung der Dauerpräparate zur Untersuchung herangezogen worden. Zuerst wurde mit den einfachsten Methoden begonnen.

a) Dauerpräparate ohne vorherige Fixation.

Färbung nach Giemsa-Romanowsky.

Das Material wird auf dem Objektträger sehr dünn ausgestrichen und an der Luft getrocknet. Dann werden die Präparate 2—3 Minuten in Methylalkohol gehärtet und 15—20 Minuten in einer verdünnten Giemsalösung (1 Tropfen der Farblösung auf 1 ccm Wasser) gefärbt. Anschließend werden sie im scharfen Wasserstrahl gespült und mit Fließpapier abgetupft.

Nach dieser Methode lassen sich die Trypanosomen sehr gut färben, sie eignet sich jedoch schlecht für die Färbung der Trichomonaden. Die Form hält sich bei vielen Exemplaren nicht. Neben kreisrunden und ovalen sah ich sehr viele langgestreckte und stabförmige Gebilde, so daß ich sie auf den ersten Blick gar nicht als

Trichomonaden erkennen konnte. Der Kern war kräftig rot gefärbt und hob sich sehr deutlich von der Umgebung ab. Die Protoplasmadifferenzierung gelang in den meisten Fällen befriedigend, und die Vakuolen waren manchmal sehr gut zu sehen. Auch die undulierende Membran konnte öfters durch diese Färbemethode gut dargestellt werden. Der Endfaden konnte nur bei manchen stark überfärbten Exemplaren gesehen werden. Die Kopfgeißeln ließen sich schwer färben. Bei 20 oder mehr Präparaten, die ich nach der Giemsa-Romanowsky-Methode herstellte, konnte ich bei keinem Exemplar die Stirngeißeln wahrnehmen. Die Färbequalität war immer dieselbe, ob Trichomonas felis oder Trichomonas genitalis bovis gefärbt wurden.

Schnellfärbung nach Giemsa.

Giemsalösung wird zwecks Herabsetzung des Glyzeringehaltes mit gleichen Teilen Methylalkohol vermischt. Der Objektträger mit dünnem Ausstrich wird mit der Schichtseite nach oben in eine trockene Petrischale gelegt. Dann werden 10—15 Tropfen Farbe daraufgetropft und etwa $^1/_3$ Minute gefärbt. Anschließend werden 10—15 ccm Aqua dest. hinzugegossen, bis das Präparat vollständig bedeckt wird. Damit die Farbe und das Wasser sich mischen, wird die Schale hin- und hergeschwenkt. Nach 3—5 Minuten wird das Präparat herausgenommen, in Wasser gespült und getrocknet.

Die so gefärbten Trichomonaden wiesen eine gut erkennbare Kern- und Protoplasmastruktur auf. Der Organellenapparat ließ sich sehr schwer darstellen. Neben den normalen Formen traten sehr viele Degenerationserscheinungen auf.

Schnellfärbemethode, modifiziert nach Manceaux.

10 ccm Aqua dest. werden mit 1 Tropfen eines Gemisches von gleichen Teilen Methylalkohol und Glyzerin versetzt, dazu kommen mehrere Tropfen Giemsalösung. Mit dieser stets frisch zuzubereitenden Mischung wird je nach Dicke des Ausstriches 3—5 Minuten gefärbt.

Diese Methode lieferte im Verhältnis zu den anderen Schnellfärbungen gute Bilder. Der Kern und das Protoplasma waren deutlich voneinander zu unterscheiden. Auch konnte die Membran einigermaßen gut sichtbar dargestellt werden. Bei einigen Exemplaren konnte ich sogar den Periplast erkennen. Die Geißeln ließen sich kaum färben.

Schnellfärbung nach Shmamine.

Hierbei wird der Ausstrich auf dem Deckgläschen vorsichtig in der Flamme oder besser noch in Methylalkohol fixiert. Darauf werden 3—4 Tropfen einer 1prozentigen Kalilauge gebracht. Anschließend

wird sofort wässerige Kristallviolettlösung daraufgetropft. Dann werden die Präparate in einer Mischung von einem Teil konzentrierter alkoholischer Fuchsinlösung und 20 Teilen Wasser etwa 3 Minuten lang gefärbt, bei intensiverer Färbung länger und unter öfterem Erneuern der Farbe. Die Farbe trübt sich allmählich, und es entsteht ein feiner Niederschlag, schließlich tritt Entfärbung ein. Anschließend wird mit Wasser abgespült. Statt 1prozentiger Kalilauge ist 4—5prozentige Natriumkarbonatlösung oder Ammoniaklösung brauchbar; bei ersterer Kristallviolett besser als Fuchsin.

Die nach dieser Methode hergestellten Präparate zeigten keine besseren Eigenschaften. Die Färbung mit Giemsa ist immerhin noch angenehmer als mit Fuchsin oder Kristallviolett, da durch die Giemsafärbung die Protoplasmadifferenzierung besser gelingt.

Färbung nach Daust.

Die lufttrockenen Präparate werden 3—5 Minuten lang in konzentrierter Karbolfuchsinlösung gefärbt. Die Geißeln, die Membran, der Endfaden, der Kern und der Basalkörper färben sich sehr gut.

Nach dieser Methode färbte ich Trichomonaden in Pyometraeiter und Schleim. Im allgemeinen ließ sich der Organellenapparat mit Karbolfuchsin sehr gut darstellen. Der Achsenstab trat nicht so plastisch hervor, aber bei einigen Exemplaren konnte er sehr gut erkannt werden.

Außer mit Karbolfuchsin färbte ich trichomonadenhaltiges Material mit Karbolmethylviolett. Mit diesem Farbstoff ließ sich der Organellenapparat sehr gut darstellen.

Färbung nach May-Grünwald.

Die Präparate werden getrocknet, nicht über der Flamme erhitzt, etwa 5 Minuten gefärbt und in destilliertem (neutralem) Wasser 1 Minute abgespült. Die Farbe muß von Grübler bezogen werden. Die Mischung besteht aus $1^0/_{00}$igem gelben Eosin und 1prozentigem Methylenblau medicinale. Der Niederschlag wird in Methylalkohol gelöst. Die Präparate wiesen sehr gute Kernbilder auf. Aber sonst ist diese Methode für die färberische Darstellung der Trichomonaden wenig geeignet. Geißeln, Membran und Endfaden färben sich nicht mit.

b) Herstellung der Dauerpräparate mit vorheriger Fixation.

Es hat sich herausgestellt, daß bei den einfachen Methoden zu viele Degenerationserscheinungen auftreten, die bei morphologischen Untersuchungen sehr störend wirken. Auch daß die Geißeln sich nicht

darstellen ließen, erkläre ich mir dadurch, daß der größte Teil der Trichomonaden ihre Geißeln abwerfen.

Der Sinn der Fixierung ist die schnelle Gerinnung des Eiweißes, wodurch die Protozoen sofort getötet werden, so daß Degenerationsformen kaum gebildet werden können. Höchstens kommen leichte Schrumpfformen vor. Zur Fixation dienen die verschiedensten Säuren. Ich habe nur die einfachen Fixationsmethoden benutzt, da die komplizierten sehr viel Zeit beanspruchen, im Gebrauch zu teuer sind, was hauptsächlich für die Osmiumsäuregemische zutrifft, und für die Praxis wertlos sind.

Sublimatfixierung nach Nöller (16).

Die Präparate werden feucht in Sublimat (heiß 2—10 Minuten oder kalt 15—60 Minuten) fixiert. Nach 20—60minütigem Joden (70% Alkohol mit Jodzusatz) und anschließendem 10minütigem Entjoden in ½—1prozentigem Natriumthiosulfat und Abspülen in Wasser werden die Präparate 1 Stunde lang in Giemsalösung (1 Tropfen auf 1 ccm Aqua dest.) gefärbt. Dann erfolgt Abspülen mit Leitungswasser und Einbetten. An Stelle der Giemsalösung kann auch die Färbung der feucht fixierten Präparate mit dem Heidenhainschen Eisenhämatoxylin erfolgen.

Zur Fixierung habe ich die konzentrierte Sublimatlösung (100 Aqua dest., 7,0 Sublimat) benutzt. Dieses Verfahren, das für die Färbung der Amoeben vielfach mit Erfolg benutzt wird, eignet sich auch für die Trichomonaden.

Die auf diese Weise angefertigten Präparate zeigten durchweg gute Bilder. Die Form erhielt sich sehr gut. Der Kern trat deutlich hervor. Bei manchen konnte ich sogar den Basalkern erkennen. Der Endfaden und die Membran ließen sich sehr gut darstellen. Die Färbung der anderen Teile des Organellenapparates ließ manchmal sehr zu wünschen übrig. Nur bei sehr wenigen Exemplaren konnten Rippe, Achsenstab und Geißeln wahrgenommen werden und dann auch nur schwer.

Außer der konzentrierten Sublimatlösung verwandte ich Spiritussublimat mit 1prozentigem Eisessigzusatz. Die damit hergestellten Präparate lieferten im großen und ganzen dieselben Ergebnisse.

Ein Nachteil dieser Methode ist die sehr lange Fixationsdauer, die über zwei Stunden betragen kann.

Formalinfixierung.

Methode nach Galli-Valerio (8).

Die Präparate werden mit 4prozentigem Formalin feucht fixiert und an der Luft getrocknet. Anschließend werden sie in stark ver-

dünnter Giemsalösung (1 Tropfen auf 5 ccm Wasser) 24 Stunden lang gefärbt.

Nach dieser Methode habe ich Trichomonas felis in Darminhalt wunderbar färben können. Bei einem Exemplar konnte der Kern und Basalkörper sehr gut erkannt werden. Auch die Verbindung der beiden durch den Rhizoplasten konnte sehr gut dargestellt werden. Außerordentlich plastisch traten der Achsenstab mit seinem kolbenförmigen Anfangsteil, die Geißeln und Membran mit Rippe und Endfaden hervor. Bei allen Exemplaren konnten Geißeln, Membran mit Endfaden und Achsenstab, besonders dessen hinteres Ende, gut gefärbt werden.

Bei Trichomonas genitalis bovis, einerlei ob in Pyometraeiter oder Kultur, färbten sich die Geißeln nur mit, wenn die Präparate überfärbt wurden. Um die Struktur des Protoplasmas darstellen zu können, habe ich die Präparate anschließend in Azeton-Xylolgemischen differenziert. Hierbei muß vorsichtig vorgegangen werden, da sonst die Geißelfärbung wieder verlorengeht. (Abb. 1)[1])

Der Erfolg dieser Methode liegt in der Anwendung der stark verdünnten Farblösung. Diese Lösung kann auf alle Bestandteile viel länger einwirken, ohne daß sie sonderlich überfärbt werden. Somit kommt der Organellenapparat gut zur Darstellung. Das ist wohl auch der Grund, warum bei der Anwendung der Schnellfärbemethoden der Achsenstab nicht sichtbar wird, da das Protoplasma durch die konzentrierteren Lösungen stark überfärbt wird.

Färbemethode nach Nöller (17).

Nach der für die Giemsamethode üblichen Fixierung werden die Präparate mit Serum bedeckt, welches auf dem Präparat antrocknen soll. Die Färbung vollzieht sich durch die Serumschicht hindurch und ergibt eine sehr schöne Differenzierung der Flagellaten.

Nach diesen Anweisungen fertigte ich Präparate mit Material von der Katze an und erzielte damit sehr gute Erfolge. Zur Fixierung benutzte ich 3—4prozentige Formalinlösung. Ich vermischte das Material mit der gleichen Menge Formalinlösung und strich es auf dem Objektträger dünn aus. Wenn die Schicht getrocknet war, bestrich ich sie mittels eines Glasstabes mit reinem Pferdeserum und färbte die Präparate eine Stunde lang in verdünnter Giemsalösung.

Der Organellenapparat war sehr gut zu erkennen. Der Kern färbte sich leuchtend rot und setzte sich sehr schön vom Protoplasma ab. Der Basalkern war als ein dunkelroter, manchmal auch tief-

[1]) Die Abbildungen befinden sich am Ende der Arbeit.

blauer Punkt zu sehen, von dem die Rippe und der Achsenstab entsprangen. Anstatt mit Giemsa färbte ich einige Präparate mit Säure- und Karbolfuchsin. Die Färbung gelang ebenso gut. Aber hierbei erreichte ich nicht die Differenzierung, wie sie bei der Giemsafärbung erzielt wird. Die Färbedauer beträgt allerdings bei Säure- und Karbolfuchsin nur 3—5 Minuten, was bei der Herstellung der Dauerpräparate zur schnelleren Diagnose zu berücksichtigen ist.

Die Rindertrichomonaden, einerlei ob in Kultur oder in Pyometraeiter, färbten sich nach dieser Methode nicht so gut. Damit die Geißeln sichtbar wurden, mußte länger gefärbt werden, wobei das Protoplasma stark überfärbt wurde. Um doch eine gewisse Protoplasmadifferenzierung zu erzielen, legte ich die Präparate in Azeton-Xylolgemische unter ständiger mikroskopischer Kontrolle. Manchmal gelang es mir, den Organellenapparat besser darzustellen, ohne daß die Geißelfärbung ganz und gar verschwand. (Abb. 2)[1])

c) Budapester Färbemethode, modifiziert nach Hees.

Die lufttrockenen Präparate werden 10 Minuten in Methylalkohol gehärtet und mit Giemsa gefärbt, die mit Pufferlösung (500,0 Aqua dest., 0,75 Natriumphosphat, 0,245 Kaliumphosphat, 0,004 Kaliumchlorid) verdünnt worden ist.

Hees (11) verdünnt das Material mit dieser Pufferlösung folgendermaßen:

Vor der Entnahme werden drei Objektträger bereitgelegt. Auf den 1. Träger werden je 1 Tropfen Pufferlösung und 1 Tropfen Kultur, ohne beide zu mischen oder in Berührung zu bringen, gebracht.

Auf den 2. und 3. Objektträger mit Platinöse 2—3 Ösen Pufferlösung von dem Tropfen des 1. Objektträgers übertragen.

Hierin 1 Platinöse Kultur von dem Tropfen auf dem 1. Objektträger verreiben und so ausbreiten, daß es sofort innerhalb einiger Sekunden trocknet.

Diese Maßnahmen müssen so schnell wie möglich vorgenommen werden, damit die Kulturlösung, die später gefärbt werden soll, der Luft vor dem eigentlichen Trocknen nur ganz kurze Zeit ausgesetzt wird. Auch soll möglichst wenig Flüssigkeit genommen werden, so daß der Ausstrich nicht als Flüssigkeitsschicht auf dem Objektträger stehenbleibt.

Anfangs brachte ich mit der Pipette einen Tropfen Kultur mit Trichomonaden auf den Objektträger und ließ darauf einen Tropfen

[1]) Die Abbildungen befinden sich am Ende der Arbeit.

Pufferlösung fallen. Die so hergestellten Präparate wiesen sehr gut gefärbte Exemplare auf. Besonders am Rande des aufgebrachten Materials konnte ich zahlreiche gut gefärbte Trichomonaden finden. In der Mitte fand ich keine oder nur geplatzte. Die Form war durchweg rund. Der Organellenapparat konnte sehr deutlich erkannt werden. Besonders die Rippe trat als tief schwarzblau gefärbter, gebogener Stab hervor.

Vom Darminhalt der Katze gelang es mir nicht, gute Präparate auf diese Art und Weise herzustellen. Auch wenn ich die Anordnung von Hees genau befolgte, gelang es mir nicht, einwandfrei gefärbte Trichomonaden zu erlangen. In den Präparaten fand ich nur geplatzte Trichomonaden. So fing ich denn an, die Wirkung der Pufferlösung unter dem Mikroskop zu studieren.

Für diesen Zweck wurde Darminhalt von der Katze, in dem manchmal Trichomonas felis in Reinkultur lebte, mit Pufferlösung verrieben und auf dem Objektträger dünn ausgestrichen. Das Ganze wurde unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1:400 betrachtet. Wenn das Material noch feucht war, bewegten sich die Trichomonaden lebhaft hin und her. Eben vor dem Trocknen blieben sie liegen und hörten auf, mit den Geißeln zu schlagen. Nach und nach wurden die Bewegungen der Membran langsamer, bis sie gänzlich aufhörten. Kurz vor dem Trocknen blähte sich die Form auf. Der Periplast riß an irgendeiner Stelle ein, wobei das Protoplasma ausfloß.

Diese Blähformen entstanden öfters in Präparaten, die mit Pufferlösung hergestellt wurden. Wahrscheinlich kommen sie durch veränderte osmotische Druckverhältnisse, die bei Anwendung der Pufferlösung herbeigeführt werden, zustande. Die Druckunterschiede können so groß werden, daß die Trichomonaden platzen.

Hees (11) stellte sehr gute Präparate von Kulturtrichomonaden in Serum-Bouillonkultur auf folgende Art und Weise her:

Drei Objektträger werden bereitgehalten. Auf die Objektträger wird je 1 Tropfen Pufferlösung mit der Pipette getropft. Auf den 1. Objektträger wird ein Tropfen Kultur gebracht. Dann wird beides mit einer Öse von etwa ½ cm Durchmesser innig gemischt. Von dieser Mischung wird eine Öse in den Tropfen auf dem 2. Objektträger gebracht und gemischt. Von diesem wieder eine Öse auf den 3. Objektträger gebracht und mit dem Tropfen Pufferlösung vermischt. Alle drei Präparate werden dünn ausgestrichen, damit sie schnell an der Luft trocknen. Anschließend werden sie in verdünnter Giemsalösung gefärbt.

Sollten Präparate von Pyometraeiter hergestellt werden, so wird das Material mit gleichen Teilen Pferdeserum vermischt (Wagner [28]).

Die auf diese Art und Weise hergestellten Präparate von Kulturmaterial liefern sehr gute Ergebnisse.

Auf dem ersten Ausstrich erscheinen die Trichomonaden als schlanke Formen. (Abb. 3)[1])

Auf dem zweiten sieht man außer den schlanken sehr viele ovale bis kreisrunde Formen. Auf dem dritten Ausstrich entdeckt man fast durchweg die Blähformen. Alle Einzelheiten des Organellenapparates sind deutlich zu erkennen. Besonders hebt sich der Achsenstab als ein rotgefärbter Stab vom hellblaugefärbten Protoplasma ab. (Abb. 4)[1])

Von allen Färbemethoden, die ich bis jetzt ausprobiert habe, ist die Methode nach Hees die beste. Sie ist nicht nur die geeignetste, weil sie sehr gute Bilder liefert, sondern weil sie von allen Färbemethoden die zuverlässigste ist und deswegen für die Anwendung zwecks Diagnose am ehesten in Frage kommt. Wenn gute Färbepräparate angefertigt werden sollen, so muß reichhaltiges Material verwendet werden. Allerdings ist bei dieser Methode ein Nachteil vorhanden, weil das Material mehrere Male mit Pufferlösung verrieben werden muß und sich deswegen sehr stark verdünnt. Wenn in dem Untersuchungsmaterial Trichomonaden nur spärlich vorhanden sind, so muß manchmal das Präparat sehr lange untersucht werden, bis eine gut gefärbte Trichomonade gefunden wird. Manchmal findet man sie überhaupt nicht, da sehr viele Trichomonaden infolge der Verarbeitung platzen. Es ist fast unmöglich, von älterem Pyometraeiter, in dem einige Trichomonaden leben, gute Bilder anzufertigen. In den 20 Präparaten, die ich herstellte, sah ich einige geplatzte und andere Formen, die ich nicht sofort als Trichomonaden erkennen konnte, während ich im Nativpräparat durchschnittlich bei starker Vergrößerung 4—5 Exemplare entdeckte. Nun kommt hinzu, daß das ältere Material sehr stark mit Bakterien durchwachsen ist, so daß die Trichomonaden manchmal vollkommen überdeckt werden. Mit Mühe und Not können sie im gefärbten Präparat an ihren Geißeln erkannt werden.

Sehr große Schwierigkeiten entstehen auch bei der Verarbeitung des außerordentlich vielgestaltigen Materials. Es kann je nach dem Krankheitsgrade der Trichomoniasis sehr dünnflüssig, schaumig, fadenziehend und sehr zähe sein. So muß man bei Untersuchungen mit Hilfe der Färbemethoden sehr viel Geduld und Erfahrung besitzen, um das Material dementsprechend für die Färberei vorzubereiten. Große Schwierigkeiten entstehen, wenn von dem sehr zähen Vaginalsekret Dauerpräparate angefertigt werden sollen. An-

[1]) Die Abbildungen befinden sich am Ende der Arbeit.

fangs gelang es mir nicht, gut gefärbte Trichomonaden zu bekommen. Ich entdeckte in den Präparaten nichts als stabförmige oder längliche Trichomonaden, bei denen nur der Kern und das Protoplasma gefärbt waren. Ab und zu färbte sich die Membran mit. Auch wenn mit Farbstoffen gefärbt wurde, die beizend wirken, wie Karbolfuchsin und Karbolmethylviolett, konnten bessere Ergebnisse nicht erzielt werden. Nach vielen Untersuchungen erkannte ich, daß die Schleimsubstanz an den Mißerfolgen schuld war. Denn durch die Verreibung des Materials mit der Pufferlösung soll nach meinen Erkenntnissen in der Umgebung der Trichomonade ein Unterdruck erzeugt werden, so daß sie sich aufbläht. Da der zähe Schleim die Trichomonade umgibt, wird sie infolge der zähen Konsistenz daran gehindert, sich aufzublähen. So muß bei Verarbeitung des schleimigen Materials darauf geachtet werden, daß der Schleim sich auflöst. Meine Versuche in dieser Hinsicht haben gezeigt, daß das Material auf folgende Art und Weise vorbereitet werden muß: Etwas Schleim wird mittels einer Öse (0,5 cm Durchmesser) auf einen Objektträger gebracht und dünn ausgestrichen, dann wird ein Tropfen Pufferlösung auf das ausgestrichene Material getropft und mit der Öse solange verrieben, bis Material und Lösung sich miteinander vermischt haben und nicht mehr zu unterscheiden sind. Das Verreiben darf erst aufhören, wenn der Schleim aufgequollen erscheint. Dann wird eine Öse voll von dem so vorbereiteten Material auf einen zweiten Objektträger gebracht und mit einer Öse Pufferlösung in der angegebenen Weise verrieben. Wenn das Material noch nicht ganz dünnflüssig erscheint, muß weiterhin Pufferlösung hinzugesetzt werden. Wird die Flüssigkeitsschicht auf dem Objektträger zu dick, so muß das Material auf mehrere Objektträger verteilt und dünn ausgestrichen werden. Anschließend werden die Präparate 3 Minuten lang in Methylalkohol gehärtet und 30 Minuten in verdünnter Giemsalösung (1 ccm auf 10 ccm Aqua dest.) gefärbt.

Die so hergestellten Präparate weisen im allgemeinen sehr gut gefärbte Trichomonaden auf. Die Form gestaltete sich länglich. Alle Einzelheiten des Organellenapparates waren deutlich zu erkennen.

IV. Untersuchung mit trichomonadenverdächtigem Material.

Wie schon erwähnt, ist es kaum möglich, aus älterem Pyometraeiter gut gefärbte Präparate herzustellen, da die Trichomonaden häufig schon ziemlich zerfallen sind und deswegen den Farbstoff nur sehr schlecht aufnehmen. Immerhin kann es öfters möglich sein,

sie an Hand von Teilen des noch gefärbten Organellenapparates zu erkennen. So habe ich versucht, aus Material mit schon abgestorbenen Trichomonaden Färbepräparate herzustellen. Hierbei muß darauf hingewiesen werden, daß im Nativpräparat massenhaft abgestorbene Trichomonaden, erkenntlich an der länglichen Form, vorhanden waren. An Hand von Resten des gefärbten Organellenapparates konnte ich vielfach die im Nativpräparat verdächtigen Gebilde einwandfrei als Trichomonaden erkennen. Manchmal waren der Kern und der Basalkörper, bei anderen Formen nur der Achsenstab sehr deutlich gefärbt. Außerdem konnte ich vereinzelt beobachten, daß der ganze Organellenapparat außerhalb des Protoplasmaleibes lag. Wenn derartiges Material noch einige Tage aufbewahrt war, und im Nativpräparat nur noch zerfranste Formen der Protozoen vorhanden waren, die aber nicht als Trichomonaden angesprochen werden konnten, war es auch im Färbepräparat nicht mehr möglich, diese zerfallenen Formen als Trichomonaden darzustellen.

Auch gelang es mir nicht, einzelne verdächtige Gebilde im Scheidenschleim trichomonadenkranker Rinder auf dem färberischen Wege als Trichomonaden einwandfrei darzustellen. Die meisten Formen platzten beim Behandeln oder färbten sich nur sehr schlecht. Ab und zu fand ich eigenartige, verfilzte Gebilde mit einem schwachblau gefärbten Zellkern. Ob es sich hierbei um zystenähnliche Formen gehandelt hat oder nicht, wage ich nicht zu entscheiden. Einmal gelang es mir, Trichomonaden auf färberischem Wege einwandfrei festzustellen, wobei im Nativpräparat keine gefunden werden konnten. Es handelte sich hierbei allerdings um Kottrichomonaden, die sehr viel in zystenähnlicher Form vorkommen und auch unbewegliche Formen bilden, mit denen Rinder vaginal infiziert worden waren. Vier Tage nach der künstlichen Infektion untersuchte ich den Vaginalschleim und fand im Nativpräparat keine Trichomonaden. Auch verdächtige Formen konnte ich nicht feststellen. Im gefärbten Präparate nach der Heesschen Methode hergestellt und 4 Stunden in verdünnter Giemsalösung (0,25 ccm Giemsa auf 1 ccm Aqua dest.) gefärbt, entdeckte ich dagegen sehr viele gut gefärbte Kottrichomonaden, die an den 5 Geißeln und an dem sehr langen Endfaden deutlich zu erkennen waren.

V. Schlußbetrachtung.

In meinen Untersuchungen habe ich eine Reihe der verschiedensten und gebräuchlichsten Färbemethoden geprüft, um festzustellen, ob sie sich für die Diagnose der Trichomoniasis des Rindes

besser eignen als das Nativpräparat, diesem gegenüber Vorteile bieten oder beide Methoden sich wesentlich ergänzen können. Hierbei bin ich auf Grund der obigen Feststellungen zu dem Ergebnis gekommen, daß trotz der Vervollkommnung der Färbemethoden, wodurch diese zweifellos an Zuverlässigkeit gewonnen haben, das Nativpräparat zur Erkennung der Trichomonaden in Pyometraeiter und Scheidenschleim des Rindes zu bevorzugen ist, weil es einfach und bequem in der Praxis hergestellt werden kann und durchweg bessere Ergebnisse liefert als die geprüften Färbemethoden. Auch Vitalfärbungen, die in erster Linie der Diagnose der Trichomoniasis beim Menschen dienen, versagen sehr oft. In der Humanmedizin können die verschiedenen Färbearten eher angewandt werden, da bei der Trichomonas vaginalis hominis zystenähnliche Formen vorkommen, die auf dem Wege der Färbungen besser dargestellt werden können. Da diese Eigenschaft, zystenähnliche Formen zu bilden, bei den Genitaltrichomonaden des Rindes bis jetzt noch nicht einwandfrei nachgewiesen ist, hat die Anwendung der Färbemethoden für die Diagnose der Trichomoniasis des Rindes keine praktische Bedeutung.

Auf Grund meiner Untersuchungen komme ich zu folgenden Ergebnissen:

1. Im Nativpräparat können bei Hellfeld lebende Trichomonaden sehr gut erkannt werden, abgestorbene nur dann, wenn sie zahlreich vorkommen, und die längliche Form noch gut erhalten ist. Die Dunkelfeldmethode ist für die Praxis nicht zu empfehlen, da sie umständlicher ist und gegenüber der Hellfeldmethode keine Vorteile bietet in bezug auf die Diagnosestellung. Für morphologische Studien dagegen ist das Dunkelfeld dem Hellfeld wesentlich überlegen.
2. Durch die Vitalfärbung mit Methylenblau oder mit dem Riegelschen Chloroform-Azur können bewegliche und unbewegliche Trichomonaden an ihren Einschlüssen oder Schollen erkannt werden.
3. Zur Herstellung von Trichomonadendauerpräparaten eignen sich am besten die Färbemethoden nach Galli-Valerio, Hees und die Nöllersche Serummethode.
4. Bei der Trichomonas genitalis bovis lassen sich die Geißeln nach der Methode von Nöller und Galli-Valerio nur deutlich darstellen, wenn das Protoplasma stark überfärbt wird.
5. In Kultur und Pyometraeiter lassen sich die Trichomonas genitalis bovis am besten nach der Methode von Hees darstellen. Aus dem

Vaginalsekret lassen sich gute Präparate herstellen, wenn sehr viele Protozoen vorhanden sind, und das Material ausgiebig mit der Pufferlösung verrieben wird.

6. Abgestorbene Trichomonaden lassen sich sehr schlecht färben. Bei zahlreichem Vorkommen kann man einzelne Protozoen an Hand von Resten des noch gefärbten Organellenapparates erkennen.
7. Bei Verdacht der Trichomonadenerkrankung des Rindes bieten die verschiedensten Färbemethoden gegenüber dem einfachen Nativpräparate keine besonderen Vorteile für die Sicherung der Diagnose.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Küst für das interessante Thema sowie das lebhafte Interesse nochmals ehrerbietigst zu danken. Ferner möchte ich nicht versäumen, Herrn Dr. habil. O. Wagner, Leiter des Parasitologischen Laboratoriums der I.G.-Farbenindustrie AG. Werk Höchst, für seine liebenswürdige Unterstützung meinen aufrichtigsten Dank zum Ausdruck zu bringen.

Autorenverzeichnis.

1. Bélar: Die Technik der deskriptiven Cytologie (Abhdlg. im Buche: Methodik der Wissenschaftlichen Biologie v. Pétéri, 1. Band: Allgemeine Morphologie).
2. Bender, W. u. Hettche, O.: Zur Diagnose der Trichomonaden. Ztrbl. f. Gyn. 1934, 930.
3. Bensen, W.: Untersuchungen über Trichomonas intestinalis und vaginalis des Menschen. Arch. f. Protistenk. 1909, Bd. 18, 115.
4. Daust, E.: Beitrag zur Klinik und Behandlung des Trichomonadenabortes des Rindes. Diss. Gießen 1934.
5. Doflein: Lehrbuch der Protozoenkunde. 2. Aufl. Jena 1909. Verlag Fischer.
6. Donné, A.: Recherches microscopiques sur la nature du mucus. Paris 1837.
7. Drescher und Hopfengärtner: Der Trichomonadenabortus des Rindes. Münch. Tierärztl. Wchschr. 1933, 1909.
8. Galli-Valerio: Notes de Parasitologie. Ztrbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. XVII. Band, Nr. 9, 1900, S. 305 bis 308.
9. Gildemeister: Titel noch nicht bekannt, wird veröffentlicht im Ztrbl. f. Bakt. und Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.
10. Glage: Kompendium der angewandten Bakteriologie für Tierärzte. 2. Aufl. 1913.
11. Hees, E.: Briefliche Mitteilung an Dr. Wagner v. 21. X. 1936.
12. Hegner, R.; Robert, W.; Elery, R. und Becker: The Diagnosis of Intestinal Flagellates by Culture Methods, Department of Medical Zoology, School of Hygiene and Public Health, Johns Hopkins University.
13. Mazzanti, E.: Eine neue Geißelinfusorie in Scheide und Uterus von Jungrindern. Giornale della Rc. Soc. Vet. 1900, 26. Ref. Ellenberger-Schütz. Jahresberichte 1900, S. 134.
14. Matsudo, Kazuhiko: Vitail Staining of Trichomonas vaginalis. J. orient. Med. 23, 109 (1935).
15. Neumann u. Mayer: Atlas und Lehrbuch wichtiger tierischer Parasiten und ihrer Überträger. Lehmanns Verlag, München 1914.
16. Nöller: Die wichtigsten parasitischen Protozoen des Menschen und der Tiere. 1. Teil. Berlin 1922. Verlagsbuchhdlg. Richard Schoetz.
17. Nöller: Eine halbtrockene Giemsafärbung für Darmflagellaten, Klinische Wchschr. 1924, 808.
18. Oehler, R.: Schnellfärbung von Darmflagellaten. Dtsche. Med. Wchschr. 1922, Nr. 14, S. 456.

19. Pfenninger, W.: Weitere Beobachtungen beim sporadischen Abort des Rindes. Münch. Tierärztl. Wchschr. 1927, 217.
20. v. Prowazek, S.: Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 21.
21. Riedmüller: Über die Morphologie, Übertragungsversuche und klinische Bedeutung der beim sporadischen Abort des Rindes vorkommenden Trichomonaden. Ztrbl. f. Bakt. u. Parasitenk. u. Infektionskrankh. 1. Abt. 1928.
22. v. Rodenwaldt: Flagellaten als Parasiten der menschlichen Körperhöhle. Handbuch der pathogenen Protozoen, 3. Band. Leipzig 1931, Verl. v. Barth.
23. Schmid u. Kamniker, H.: Trichomonas vaginalis. Arch. f. Gyn. 1926, 362.
24. Streit, K.: Zur Diagnostik der Trichomonas vaginalis. Schweiz. med. Wchschr. 1936, 54—56.
25. Szendi, B. (Debrecen): Durch Trichomonas vaginalis verursachte unbiologische Veränderungen in der Scheide von Schwangeren. Ztrbl. für Gynäkologie 1937. Nr. 19, 1125—1126.
26. Sziklai, A.: Trichomonaden im Uterus des Rindes. Wien. Tierärztl. Wchschr. 1933, 701.
27. Uhlenhuth u. Kraus: Handbuch der mikrobiologischen Technik 1923, 1. Band.
28. Wagner, O.: Briefliche Mitteilung vom 15. X. 1937.
29. Westphal: Zur Morphologie, Biologie und Infektionsfähigkeit der viergeißeligen Trichomonasarten des Menschen. Ztrbl. f. Bakter. u. Par. u. Infektionskrankh. 137. Bd. J. 6/7, 1936, 363—376.

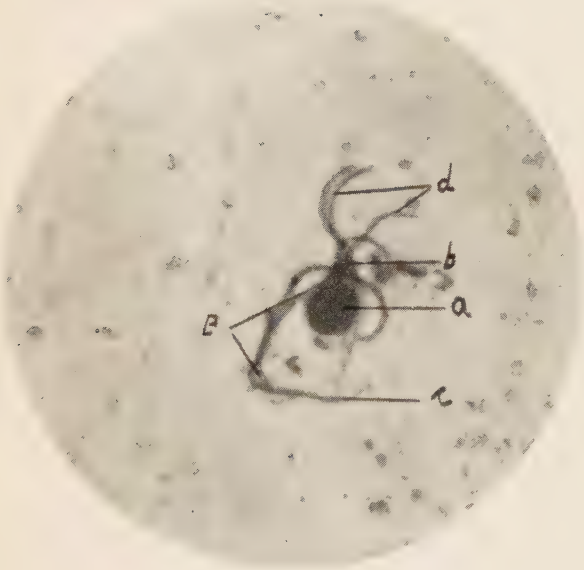

Abb. 1. Vergrößerung 800 mal.

Trichomonas genitalis bovis gefärbt nach Galli-Valerio.

Die hier gefärbten Rindergenitaltrichomonaden sind der Serum-Bouillonkultur entnommen. Der Zellkern (a), Basalkorn (b), Randfaden (c), die Geißeln (d) und die Rippe (e) sind hier deutlich zur Darstellung gekommen. Durch die Azeton-Xyloldifferenzierung ist die Färbung des Achsenstabes verlorengegangen.

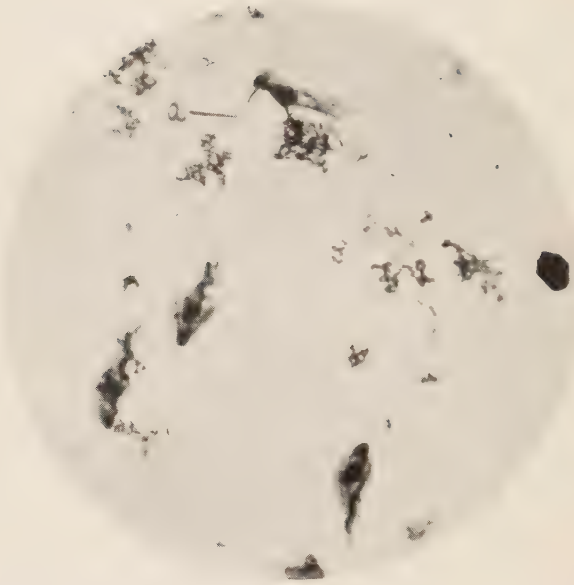

Abb. 2. Vergrößerung 600 mal.
Trichomonas genitalis bovis gefärbt nach der Nöllerschen Serummethode.

Als Material diente hier wiederum die Serum-Bouillonkultur. Dieses Bild zeigt eindeutig, daß die Darstellung des Organellenapparates der Rindertrichomonade nicht so gut gelingt. Die Färbung der Geißeln (a) und des Randfadens (b) ist teilweise durch die Azeton-Xyloldifferenzierung verlorengegangen. Auch die Darstellung des Achsenstabes und der Rippe ist undeutlich.

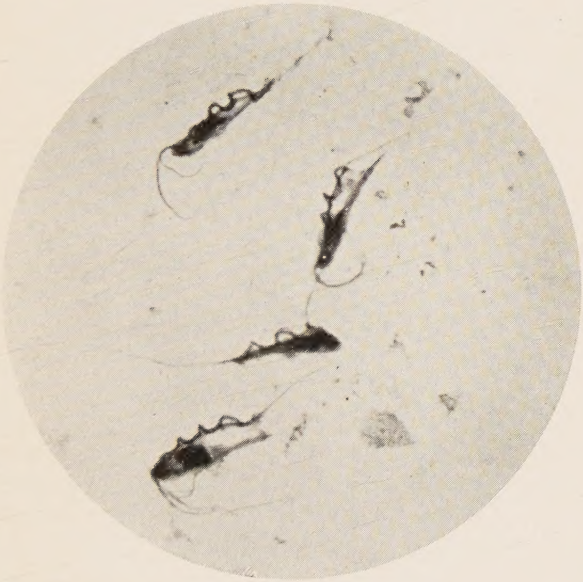

Abb. 3. Vergrößerung 600 mal.
Trichomonas genitalis bovis (Serum-Bouillonkultur) gefärbt nach der Methode von Hees.

Auf diesem Bilde erscheinen die Trichomonaden als sehr schlanke Formen. Die Einzelheiten des Organellenapparates sind wesentlich besser zu erkennen als bei den Trichomonaden, die nach den vorher erwähnten Methoden gefärbt wurden. Alle Exemplare im Präparat ließen sich durchweg gleich gut färben.

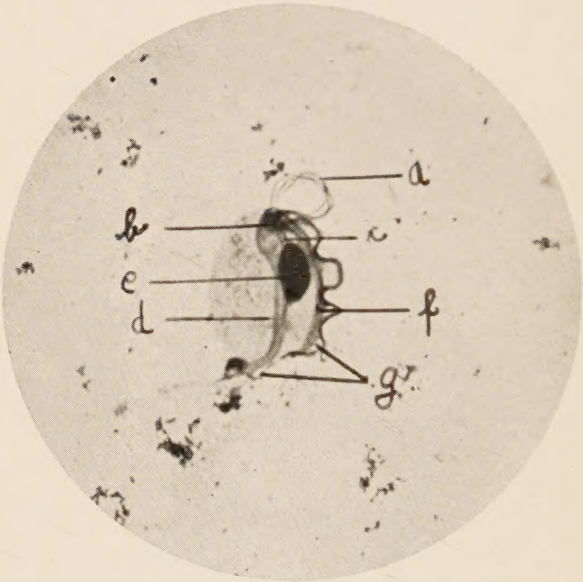

Abb. 4. Vergrößerung 800 mal.
Trichomonas genitalis bovis (Serum-Bouillonkultur) gefärbt nach der Methode von Hees.

a Stirngeißeln b Basalkern c Rhizoplast d Achsenstab e Zellkern f Rippe g Membran und Randfaden. Diese Abbildung zeigt deutlich, daß die Rindertrichomonaden im dritten Ausstrich sich infolge Einwirkung der Pufferlösung aufblähen und deshalb kugelige Gestalt annehmen. Dadurch kommt der Organellenapparat sehr deutlich zur Darstellung, so daß hier alle Einzelheiten zu erkennen sind. Fast alle Exemplare im Präparat konnten deutlich dargestellt werden.

Lebenslauf.

Am 19. Februar 1913 wurde ich, Heinrich Maaßen, als Sohn des Lehrers Nicolaus Maaßen und seiner Ehefrau Dorothea geborene Thietje in Altona a. d. Elbe geboren. Nachdem ich meine erste Schulausbildung in der Mittelschule zu Preetz erhalten hatte, besuchte ich von Untersekunda ab die Oberrealschule in Eutin, wo ich am 10. März 1932 das Reifezeugnis erhielt.

Alsdann widmete ich mich dem Studium der Veterinärmedizin. Bis zum vollendeten Vorexamen studierte ich an der Universität in Kiel und an der Tierärztlichen Hochschule zu Hannover. Vom Sommersemester 1935 ab studierte ich in Gießen, woselbst ich am 28. Juni 1937 die tierärztliche Staatsprüfung bestand. Die Ausbildung in der Fleischbeschau und Lebensmittelüberwachung erhielt ich von Juli bis September 1937 am Schlachthof in Frankfurt am Main. Seitdem bin ich als Assistent an der Geburtshilflichen und Ambulatorischen Veterinärklinik zu Gießen beschäftigt. Seit August 1936 befasse ich mich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.